

氏 名	まちだ えりか 町田 枝里華
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 744 号
学位授与年月日	令和 7 年 3 月 17 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	大腸癌術後補助化学療法の治療効果予測に有用な新規因子の検討
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教授 福嶋 敬宜 (委 員) 教授 山口 博紀 教授 宮谷 博幸

論文内容の要旨

1 研究目的

大腸癌は罹患数・死亡数ともに世界における主要ながん種である。大腸癌に対する治療は病期や腫瘍局在などに応じて手術、化学療法、放射線治療を中心に行われるが、stage III 大腸癌に対する標準治療は切除術に続く補助化学療法 (AC : adjuvant chemotherapy) である。しかし、AC の効果は患者によって異なり、根治切除後の stage III 大腸癌患者の 15-50% は再発を来すとされる。これまでに大腸癌患者の予後予測を目的として、遺伝子変異や遺伝子発現シグネチャー等様々なバイオマーカーが検索されてきたが、AC の効果予測に有用なマーカーについては一定の見解がない。正確かつ標準化されたバイオマーカーの同定によって、AC の効果を予測し、治療の恩恵をより受けられる、あるいは受けにくい集団を抽出できれば、大腸癌患者の個別化医療の実現に有用であると考ええる。本研究では、腫瘍組織から得られた transcriptome データと体細胞変異データに基づき、AC の効果や再発に対する予測因子を同定することを目的とした。

2 研究方法

国立がん研究センター中央病院で 1997 年から 2019 年の間に stage III 大腸癌に対する切除術を受けた 253 人の患者の凍結腫瘍組織検体を使用し、RNA sequencing、targeted sequence を実施した。RNA-seq データを使用して Consensus Molecular Subtype (CMS) によるサブタイプ分類、Kraken2 による microbiome 解析、CIBERSORT による免疫フラクション解析、MiXCR による T 細胞受容体 (TCR) レパトア解析、DESeq2 による発現変動遺伝子解析を実施。Targeted sequence については、大腸癌との関連が指摘されている 17 遺伝子を対象にパネル検査を設計し、体細胞変異解析を実施した。上記の解析に基づき、AC 施行群における無再発生存期間 (RFS) と関連する因子の同定と、これらの因子を用いた再発に対する予測モデルの構築が可能か検討を行った。

3 研究成果

253 例のうち、118 例 (46.6%) が AC を受けており、再発は 76 例 (30.0%) に認めた。AC 施行群は未施行群と比較して有意に若年であった ($P = 3.6E-07$)。

<RNA-seq>

CMS1: 15 例、CMS2: 73 例、CMS3: 111 例、CMS4: 54 例に分類され、各サブタイプの特徴は欧米コホー

トを中心とした既報とほぼ同様であった。Kraken2によるmicrobiome解析では、20門・382属・799種の細菌が同定され、247例(97.6%)で*Fusobacterium*門が存在していた。生存時間解析では、AC施行群でM1/M2マクロファージの存在量、*Fusobacterium*属の存在量、CD8陽性T細胞の存在量×TCRの多様性と、無再発生存期間(RFS)の関連性が示唆された。AC施行群118例を対象とした多変量解析では、腫瘍組織の*Fusobacterium*属の存在量(ハザード比[HR]=2.87;95%信頼区間[CI]=0.87-9.51;P=0.048)およびTCR α/δ (TRAD)の多様性(HR=0.41;95%CI=0.20-0.87;P=0.020)が独立してRFSと関連することが示された。また、M1マクロファージの存在量もRFSと関連する傾向を認めた(HR=0.49;95%CI=0.23-1.04;P=0.055)。上記の結果を踏まえ、再発に対する予測モデルの構築を行った。ロジスティック回帰法を使用したモデルでは、既知の4つの臨床病理学的因子(性別、腫瘍部位、T stage、N stage)に加えてM1マクロファージ(受信者動作特性曲線下面積[AUC]=0.853)、TRAD(AUC=0.838)、および両因子(AUC=0.835)をモデル構築に用いた場合、4因子のみを用いたモデル(AUC=0.833)と同等以上の予測能を示した。

<Targeted-seq>

*TP53*変異:76%、*APC*変異:70%、*KRAS*変異:41%、*PIK3CA*変異:13%、*BRAF*変異:6%の順に頻度が高く、AC施行群とAC未施行群で分布に差は見られなかった。生存時間解析では、AC施行群において、*KRAS*変異患者は野生型患者と比較してRFSが有意に短縮した(P=0.039)。ACのレジメン別(フルオロウラシル系[FU]単剤、オキサリプラチン[OX]併用、AC未施行)の3群間で検討を行った結果、*KRAS*野生型患者においてOX併用群が最もRFSが短縮した(P=0.01)。この結果については、OX併用レジメンが標準治療として実施されている現状を踏まえると、追加の検討が望ましいと判断した。症例収集期間を2020年の手術患者まで拡大し、390例を対象に同様の検討を行ったところ、AC施行群における*KRAS*変異患者と野生型患者のRFSに有意差はみられなかった(P=0.21)。また、*KRAS*野生型集団におけるACのレジメン別生存解析でも、RFSに有意差はみられなかった(P=0.23)。*KRAS*変異について、変異サブタイプ別に再発との関連性を検討したところ、AC施行群においてG12V変異を有する患者はRFSが有意に短縮した(P=0.048)。一方、AC未施行群ではG12D変異を有する患者はRFSが短縮する傾向を認めた(P=0.072)。

4 考察

本研究ではACの効果予測に有用なバイオマーカーの候補として*Fusobacterium*、TRAD、M1マクロファージが同定された。

*F. nucleatum*はヒト大腸癌組織に多く存在する細菌であり、その存在量は大腸癌の再発や予後と有意に相関している。Wnt/ β -カτεニン経路の活性化や腫瘍微小環境への免疫抑制性細胞や腫瘍関連マクロファージ(TAM)等の誘導によって腫瘍進行を促進し、また、オートファジーの活性化やアポトーシスの阻害により化学療法抵抗性を誘導すると報告されている。TCRはV(D)J再配列機構によって多様性が生じ、T細胞による特異的な抗原認識を可能にする。TCRの多様性は大腸癌患者の良好な予後や、直腸癌の術前化学放射線療法に対する良好な反応性と関連しているとの報告がある。マクロファージは、抗腫瘍活性を持つ炎症性のM1型と、腫瘍促進的に働く免疫抑制性のM2型に分類される。大腸癌組織におけるTAMの高浸潤は良好な予後と関連しており、ACを受けた大腸癌患者において、腫瘍のTAM濃度は再発の独立した予測因子であると報告されている。また、M1型TAMは腫瘍細胞のアポトーシスを促進し、マクロファージのM1型TAMへの分化促進によってOX耐性を改善することが知られている。これらの知見から、*Fusobacterium*、TCR、M1マクロファージが化学療法への反応性・抵抗性に関与する可能性が高いと

考えられる。

また、本コホートの体細胞変異スペクトラムは、既報の欧米人コホートを中心とした変異頻度とほぼ同様であった。*TP53*, *APC*, *KRAS* 変異の有無と再発との関連は認めなかったが、特定の *KRAS* 変異サブタイプが AC の効果予測因子として有用な可能性が示唆された。

5 結論

Stage III 大腸癌において、腫瘍組織の *Fusobacterium* 存在量、TCR 多様性、M1 マクロファージ存在量は術後補助化学療法への反応性のバイオマーカーとして機能する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、Stage III 大腸癌に対する補助化学療法(AC)の効果や再発に対する予測因子を同定することを目的とし、当該患者 253 例の凍結腫瘍組織検体から、RNA sequencing、targeted sequence を実施し、Consensus Molecular Subtype (CMS) 分類、microbiome 解析、免疫フラクション解析、T 細胞受容体 (TCR) レパートリー解析、遺伝子発現変動解析を行っている。これらの解析に基づき、AC 施行群における無再発生存期間 (RFS) と関連する因子の同定と、再発予測モデルの構築を検討している。

本研究では、最終的に *Fusobacterium*、TRAD、M1 マクロファージが AC の効果予測に有用なバイオマーカー候補として同定されたとしている。*Fusobacterium* は腫瘍進行や化学療法抵抗性に関与する可能性、TCR 多様性は免疫応答と関連する可能性、M1 マクロファージは抗腫瘍活性を持つことが知られており、これらの因子が化学療法への反応性・抵抗性に関与する可能性が高いと考察している。また、特定の *KRAS* 変異サブタイプが AC の効果予測に有用な可能性も示唆している。

複数の解析から、当初の目的であった AC の効果予測に有用なバイオマーカー候補の同定まで行えたことは評価できる。一次審査会では、オキサリプラチンレジメンを使用した症例の予後が悪いことについて症例選択バイアスについての指摘があったが、症例数も追加した検討がなされたことで、より価値ある結果になったと考える。その他、審査員から出された指摘事項について、一つ一つ適切な回答および改訂がなされたため、全審査委員一致で学位論文として相応しい内容であると判断した。

最終試験の結果の要旨

学位審査会では、申請者が行った研究及び提出された学位論文に関するプレゼンテーション(最終試験)が行われた。申請者の外科医としての経験や臨床課題から設定された、「Stage III 大腸癌に対する補助化学療法 (AC) の効果や再発に対する予測因子を同定」という課題について、様々な解析を行ってそれにアプローチしたことやその結果が分かりやすく示された。

その後、審査員からの質問コメントについても、研究課題や結果に大きな問題は指摘されなかったが、学位論文原稿についての事実関係の確認、あいまいな表現、追加考察の要望などが出され、それらについても適切な回答および修正の意思が示された。

以上、研究結果、執筆された学位論文およびそのプレゼンテーションを通して、申請者は本学の学位授与に値する学識を有すると審査委員全員一致で判断した。